

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10984

研究課題名(和文)脾臓由来M1型及びM2型単球系細胞を介した神経障害性疼痛発症のメカニズム解明

研究課題名(英文) Analysis of mechanisms of induction of neuropathic pain via M1 and M2 type of splenic monocytes

研究代表者

柴崎 雅志 (Shibasaki, Masayuki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：20405319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：神経障害性疼痛のメカニズムに脾臓由来単球系細胞が関与しているかどうかをSNIモデルに脾臓摘出術の有無を加え、検討した。機械刺激に対する痛覚閾値の検討では、両群でモデル作成後、1日目より痛覚閾値の有意な低下を認めた。この痛覚閾値の低下は傷害側および非傷害側ともに認められるが、SNIモデル単独群の非傷害側と比較し、脾臓摘出術を加えた群での非傷害側の痛覚閾値が有意に低下していた。免疫組織染色では、モデル作成後に神経損傷部位に一致した単球系細胞の集積が認められ、両群の免疫組織学的検討では、術後7日目の傷害側で脾臓摘出術を加えた群の方がCD11b陽性領域が有意に少なかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで神経障害性疼痛発症のメカニズム解明には傷害側に焦点を当てた研究が主流であった。また神経損傷部位に一致した脊髄でのマイクログリア集積が知られているが、骨髄由来単球系細胞が神経損傷後に脊髄に浸潤すると報告がある。単球系細胞は脾臓にも存在するため、本研究では神経障害性疼痛モデルに脾臓摘出術を加えることで、神経損傷後に脊髄に集積する単球系細胞が脾臓由来かどうかを調査した。また脾臓摘出術を加えることで非傷害側の痛覚閾値が低下することがわかり、神経損傷後に脊髄に集積する単球系細胞が脾臓由来であり、かつそれらが脊髄内での何らかの影響を及ぼし、非傷害側の痛覚閾値の低下を引き起こしていることがわかった。

研究成果の概要(英文)：SNI model with splenectomy was used to investigate whether splenic monocytes was involved with mechanisms of neuropathic pain. Mechanical threshold was significantly decreased from day 1 after SNI or SNI with splenectomy procedure. Decreased mechanical threshold was observed in both ipsilateral and contralateral side. Mechanical threshold in the contralateral side of SNI with splenectomy was significantly decreased compared with solely SNI. Immunohistochemical analysis revealed that enhancement of signals of monocytic lineages was observed in the area of the spinal cord consistent with nerve injury. Areas of CD11b signal in the ipsilateral side on day 7 after SNI with splenectomy were significantly decreased.

研究分野：神経障害性疼痛

キーワード：神経障害性疼痛 マイクログリア M1型単球系細胞 M2型単球系細胞 脾臓

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛は神経系の直接損傷や炎症、感染など病態が多岐に渡り、また一次知覚神経細胞の他にマイクログリアなどのグリア細胞が関与するため、その発症メカニズムは複雑である。そのため未だ有効な治療法が確立されていない。近年、単球系細胞には炎症性サイトカインを産生・分泌する M1 型と抗炎症性サイトカインを産生・分泌する M2 型の 2 つの型があり、その表面抗原や機能解析が進んでいる。また脊髄損傷において損傷部位に集積する単球系細胞は脾臓から供給されていること、M1 型、M2 型が異なった時系列で損傷部位に集積することが報告されている。

2. 研究の目的

本研究では末梢神経損傷により脊髄に集積する単球系細胞の種類とその集積時期、病変部への集積を惹起する物質を調査することで、M1 型、M2 型のそれぞれを標的とした神経障害性疼痛の新たな治療法を開発したい。

3. 研究の方法

(1)動物の処置と行動解析

雄性マウス(C57/BL6)の 10 週を用い、イソフルランによる麻酔下で神経障害性疼痛の動物モデルである SNI(Spared Nerve Injury)モデルを作成した。SNI モデル作成は坐骨神経の枝である総腓骨神経と脛骨神経を結紮し、その後切離する。更に脾臓摘出をした後に SNI モデルを作成する群も作成した。

SNI モデルおよび SNI モデルに脾臓摘出術を加えたマウスに対し、von Frey Filament を用い、傷害側および非傷害側の機械刺激に対する痛覚閾値を測定した。

(2)免疫組織染色

未処置マウス、SNI モデルマウス、SNI モデルに脾臓摘出術を加えたマウスに対し、免疫組織染色を行った。各マウスに対し、イソフルランによる深麻酔下で DPBS による前還流を行い、その後、4%パラフォルムアルデヒドを用い還流固定した後、脊髄を採取した。採取した脊髄からパラフィン切片を作成し、CD11b および GFAP による免疫組織染色を行った。

4. 研究成果

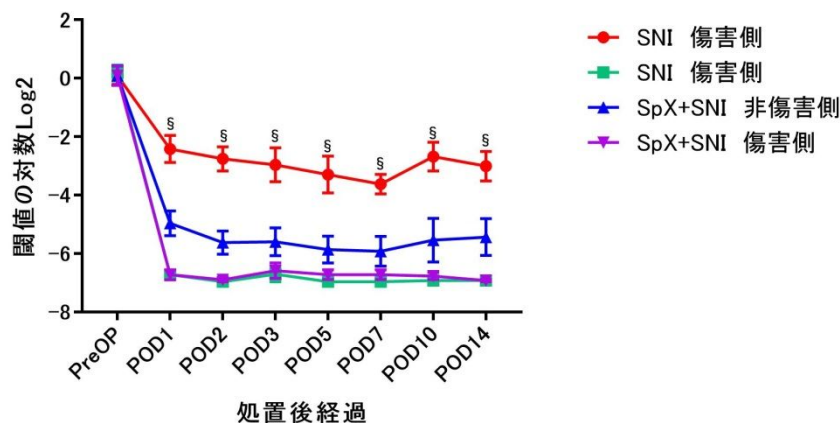
(1)行動解析結果

傷害側では SNI モデル及び SNI モデルに脾臓摘出術を加えた群でモデル作成前と比較し、共に痛覚閾値の低下が認められた。

非傷害側では SNI モデルに脾臓摘出術を加えた群では SNI モデル群に比べ、有意に痛覚閾値の低下が認められた。

SNI モデルに脾臓摘出術を加えた群では傷害側、非傷害側共に痛覚閾値の低下が認められ、モデル作成後 2 日目から 10 日目において、傷害側と非傷害側での有意な差はなかった。

図 1 に行動解析の結果を示す。



(図 1) 行動解析結果

機械刺激に対する痛覚閾値の経時的変化。

(2)免疫組織学的検討

CD11b を用いた免疫組織学的検討では、未処置群と比べ、SNI モデル作成後 7 日目の傷害側と SNI モデルに脾臓摘出術を加えた群ではモデル作成後 1 日目、7 日目で有意に増加が認められた。SNI に脾臓摘出術を加えた群ではモデル作成後 7 日目の傷害側で SNI モデルと比較し、有意に CD11b の発現が少なかった。

GFAP を用いた免疫組織学的検討では、全てにおいて、有意な発現変化はなかった。

(3)今後の展望

本研究では末梢神経損傷により脊髄に集積する単球系細胞が脾臓由来であるという仮説に基づいて行われた。脾臓摘出後、直ちに末梢神経損傷を行ったが、行動解析による機械刺激に対する痛覚閾値の検討では脾臓摘出による傷害側の痛覚閾値低下を抑制できなかった。このことから末梢神経損傷による機械刺激に対する痛覚閾値の低下の発症初期には脾臓の関与はないことが示唆される。また新たな知見とし、末梢神経損傷に脾臓摘出を加えることで非傷害側の機械刺激に対する痛覚閾値の低下が認められた。しかしながら、本研究ではそのメカニズム解明にまで至っていない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	天谷 文昌 (Amaya Fumimasa) (60347466)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	